Electronic gene chip detecting method

Patent number:	CN1422961
Publication date:	2003-06-11
Inventor:	FAN CHUNHAI (CN); HUANG QING (CN)
Applicant:	HUASEN ELECTRONIC INFORMATION (CN)
Classification:	
- international:	C12Q1/68
- european:	
Application number:	CN20010129104 20011123
Priority number(s):	CN20010129104 20011123

Abstract of **CN1422961**

The invention is a testing method of electron gene chip, the gene chip which has electrochemistry activity base is hybridized with sample DNA, then the electron testing device replaces the fluorescence scanner to test the change of electrical signal before and after hybridization, it judges if the tested sample contains special DNA segment need to be tested, the sample DNA needn't to be fluorescence processed and can change the nature directly.

Data supplied from the ***esp@cenet*** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01129104.4

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1422961A

[22] 申请日 2001.11.23　[21] 申请号 01129104.4
[71] 申请人 成都市华森电子信息产业有限责任公司
地址 610041 四川省成都市八里小区怡福路华房苑 1 幢 3 单元 2D
[72] 发明人 黄　庆　樊春海

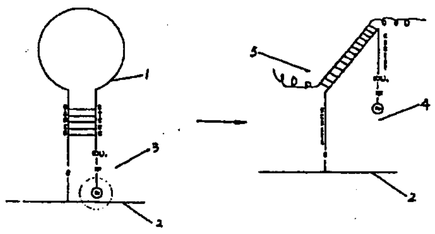
[74] 专利代理机构 成都中亚专利代理有限公司
代理人 杨俊华

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 电子基因芯片的检测方法

[57] 摘要

本发明是一种电子基因芯片的检测方法，其特点是将带有电化学活性基团的基因芯片与样品 DNA 进行杂交，然后用电子检测器取代荧光扫描仪对基因芯片杂交前后电信号的变化进行检测，判断被检测样品中是否含有待检测的特异性 DNA 片段，本发明杂交过程的样品 DNA 不需荧光处理可直接进行变性，检测设备便宜从而为人们提供了一种操作方便、成本低、检测的灵敏度与可靠性高，可以大规模普及性应用的电子基因芯片的检测方法。



ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种电子基因芯片的检测方法，其特征在于是将带有电化学活性基团的基因芯片与样品 DNA 进行杂交，然后用电子检测器取代荧光扫描仪对基因芯片杂交前后电信号的变化进行检测，判断被检测样品中是否含有待检测的特异性 DNA 片段。

2、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的检测方法，其特征在于所述电化学活性基团的基因芯片上较好是带有下述结构的 DNA 探针：

5'-NH_2-(CH_2)n-********+++++++++++++++++********-(CH_2)n-SH-

其中，*********所示为两段可以互补配对（A 与 T 配对，G 与 C 配对）的 DNA 序列；+++++++++++++++++所示为杂交过程中待检测的特异性 DNA 片段 （10-30 碱基）；所述两端的甲基（CH_2）数量 n 为 0～10。

3、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的检测方法，其特征在于所述杂交过程是:

a. 样品 DNA 直接进行变性：将样品水浴加热至沸腾，保持 1 分钟以上；从沸水中取出，立即放至冰上至完全冷却。此时，样品 DNA 已完全变性为单链。

b. 样品 DNA 杂交：将变性 DNA 样品（液体）与芯片基点上 的探针混合，20℃—45℃（随不同的探针 DNA 序列改变）保温 1-24 小时，进行杂交。

c. 芯片的洗脱：杂交完成后，用不含 DNA 样品的杂交液对芯片进行漂洗数次，温度控制在 20℃－55℃（随不同的探针 DNA 序列改变），时间持续半小时以上，直至洗去未能杂交上的样品 DNA 以及探针的非特异性吸附。

4、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的检测方法，其特征在于所述电化学活性基团可以是一种任意结构的可以产生电化学信号的基团。

5、根据权利要求 4 所述的电子基因芯片的检测方法，其特征在于所述电化学活性基团可以是羧基二茂铁或者其它甲基紫羧基衍生物类电化学活性基团。

6、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的检测方法，其特征在于所述电子检测器是电化学工作站或者其它电子检测设备。

7、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的检测方法，其特征在于所述检测流程为：a. 样品预处理，提取 DNA；b. 样品 DNA 变性；c.和芯片杂交；d. 芯片的清洗；e. 电信号的检测； f. 后期数字化信号分析。

电子基因芯片的检测方法

本发明属于 DNA 杂交检测技术领域，具体是一种电子基因芯片的检测方法。

现有技术中，基因芯片常规检测方法一荧光扫描法需要将样品 DNA 进行预处理，即对样品进行荧光标记，然后使上述基因芯片与带有荧光扫描信号即荧光标记的样品 DNA 进行杂交，然后用荧光扫描仪对杂交后的荧光信号进行检测，判断被检测样品中是否含有待检测的 DNA 片段。

然而，上述现有基因芯片常规检测方法一荧光扫描法由于下述原因使其还仅仅停留在实验室阶段，局限于科研领域；离正式投入应用还有相当大的距离：1、检测成本很高，一般只有大型制药公司和经费充足的科研院所才能承受。一套商品化的基因芯片信号检测与分析系统，包括荧光扫描仪、计算机及其软件等，大约价值 20 万美元，比如美国 Affymetrix 的一套芯片系统（包括 5 片寡聚核苷酸和 1 片 cDNA 芯片）的国际市场价格就超过 15 万美元。就应用型基因芯片如诊断芯片来讲，一个很普通的传染病检测芯片单次检测成本就要约二百元人民币。由于成本是能否实现广泛应用的首要问题，所以使其普及性应用的难度非常大。2、现有检测方法必需对样品 DNA 进行复杂的预处理，主要表现为需对样品进行荧光标记。对

于单色荧光标记，虽然预处理过程相对简单，但不能得到很好的信号；而四色荧光标记信号虽然较好，但预处理过程相对复杂。这种处理过程，需要专业人员经过专门的培训才能够完成。3、上述基因芯片与带有荧光标记的样品 DNA 进行杂交所得到的荧光信号只能认为是一种定性或半定量的信号结果，而不能直接进行精确的数字化分析。这一方面对基因芯片得到的大量生物学数据的进一步分析带来很大的不便，同时也降低了信号检测的灵敏度与可靠性。

本发明目的是为了弥补现有技术的缺陷，为人们提供一种操作方便、成本低、检测的灵敏度与可靠性高，可以大规模普及性应用的电子基因芯片的检测方法。

本发明的目的是通过下述技术方案来实现的。

本发明电子基因芯片的检测方法，是将带有电化学活性基团的基因芯片与样品 DNA 进行杂交，然后用电子检测器取代荧光扫描仪对基因芯片杂交前后电信号的变化进行检测，判断被检测样品中是否含有待检测的特异性 DNA 片段。

上述方案中，所述杂交过程是:

a. 样品 DNA 不需荧光预处理直接进行变性：将样品水浴加热至沸腾，保持 1 分钟以上；从沸水中取出，立即放至冰上至完全冷却。此时，样品 DNA 已完全变性为单链。

b. 样品 DNA 杂交：将变性 DNA 样品（液体）与芯片基点上的探针混合，20℃－45℃（随不同的探针 DNA 序列改变）保温 1-24 小时，进行杂交。

c. 芯片的洗脱：杂交完成后，用不含 DNA 样品的杂交液对芯片进行漂洗数次，温度控制在 20℃－55℃（随不同的探针 DNA 序列改变），时间持续半小时以上，直至洗去未能杂交上的样品 DNA 以及探针的非特异性吸附。

上述方案中，所述电化学活性基团的基因芯片上较好是带有下述结构的 DNA 探针：

5'-NH_2-(CH_2)n-********++++++++++++++++++********-(CH_2)n-SH-

其中，********所示为两段可以互补配对（A 与 T 配对，G 与 C 配对）的 DNA 序列；+++++++++++++++++所示为杂交过程中待检测的特异性 DNA 片段 （10-30 碱基）；所述两端的甲基（CH_2）数量 n 为 0～10。

上述方案中，所述电化学活性基团可以是一种任意结构的可以产生电化学信号的基团。

上述方案中，所述电化学活性基团可以是羧基二茂铁或者其它甲基紫羧基衍生物类电化学活性基团。

上述方案中，所述电子检测器可以是电化学工作站或者其它电子检测设备。用灵敏的交流伏安法对杂交前后电信号的变化进行检测，从而判断被检测样品中是否含有待检测的特异性 DNA 片段。

正常情况下，杂交前基点上存在电信号。如果检测样品中含有探针序列（待检测的特异性 DNA 片段），则杂交后基点上的电信号消失；反之，则电信号依然存在。

本发明电子基因芯片的检测工艺流程可见图 2。

本发明技术方案的原理是：在杂交前，由于探针 DNA 两端含有

一段可完全配对的DNA序列，在自由状态下，能形成径环结构（stem loop）。此时，探针的5’末端与3’末端是靠近的，而3’末端所携带的电化学活性基团在靠近Au表面时，能够产生一个能用电化学工作站检测的电信号。杂交完成后，由于位于探针中段的特异性DNA片段和样品发生了DNA互补配对，形成正常的DNA双螺旋结构，从而破坏了径环结构。此时，探针的5’末端与3’末端不再靠近，导致了原来的电化学信号的丧失。利用这个原理，能够检测DNA是否完成了杂交配对，也即能够检测在所设计的基因芯片上DNA的杂交信号。为进一步理解上述原理，可参见附图1。

本发明的电子基因芯片的检测方法，能对DNA杂交过程中电信号产生的变化进行定量检测。该技术把成熟的微电子技术应用到基因芯片上，目前在全世界处于领先地位。

该技术使用电子检测器来检测基因芯片的信号，直接应用了微电子工业的成熟技术和成果,与现有基因芯片相比，本专利技术具有以下优点：1、检测设备造价大幅度降低，用作信号检测的电子检测器如电化学工作站，其造价远远低于现有的技术使用的荧光扫描仪，从而有利于实现平民化，进入广泛的应用领域；2、本发明上述杂交过程中对待检测的样品不需要任何标记，省去了复杂的荧光标记预处理过程与，本发明的预处理过程只需经过简单的培训，任何人都能完成。3、本发明的方法得到的电扫描信号，是一种定量的信号结果，能进行精确的数字化分析。这使对基因芯片得到的大量生物学数据的进一步分析成为可能，同时也大大提高了信号检测的灵敏度

与可靠性。表1为本发明与现有检测方法的对比情况。

表1 与现有检测方法的对比情况

	现有检测方法	本发明检测方法
样品预处理	提取DNA，并进行荧光标记	提取DNA
杂交过程	常规固-液杂交过程	常规固-液杂交过程
检测信号	荧光信号	数字化电信号
检测设备	共聚焦荧光扫描显微镜	电化学工作站或其他电信号检测设备

附图1为技术原理图。

图中：1、茎环结构；2、Au表面；3、产生电信号；4、电信号消失；5、与外源DNA杂交配对。下面是本发明的实施例，本发明不仅限于所述实施例。

实施例一

首先，将DNA探针结构为5'-NH_2-$(CH_2)_3$-GCG AG—ggatcctctagagtcga—CT CGC-$(CH_2)_6$-SH-3'，所带电化学基团为羧基二茂铁的电信号检测的基因芯片（其中ggatcctctagagtcga为本实验中选用的特异性DNA序列，是pUC18载体上的一段，与之相应，用于杂交的DNA选用pUC18载体）取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为9uA（对Ag/AgCl，200mv）。以备本例下述样品DNA的杂交所需。所述电信号检测的基因芯片的制备方法可参见其它专利。

本例的样品DNA的杂交过程是：

a. 样品DNA的变性：提取pUC18质粒DNA（10uL，约1ug），沸水浴5分钟，迅速置于冰上，使DNA变性，此时，样品DNA已

完全变性为单链。

b. 样品 DNA 杂交：将变性 DNA 样品（液体）与上述所备电信号检测的基因芯片基点上的探针混合，即将变性的 pUC18 质粒点在基点上，20℃－45℃（随不同的探针 DNA 序列改变）保温 1-24 小时，进行杂交，本例为 37℃保温 2 小时。

c. 芯片的洗脱：用不含 DNA 样品的杂交液对芯片进行漂洗数次，温度控制在 20℃－55℃（随不同的探针 DNA 序列改变），时间持续半小时以上，直至洗去未能杂交上的样品 DNA 以及探针的非特异性吸附。本例杂交完成后，用双蒸水清洗芯片，并将芯片置于 45℃的双蒸水中漂洗数次，约 30 分钟。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为 2uA（对 Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有 pUC18 质粒。

实施例二

本例购买或合成含有下述结构的 DNA 探针的，所带电化学基团为羧基二茂铁的电信号检测的基因芯片：

$5'\text{-NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-ATGCGT}-\boxed{\text{ggatcctctagagtcga}}-\text{ACGCAT-(CH}_2)_6\text{-SH-3'}$

$\boxed{\text{ggatcctctagagtcga}}$为本实验中选用的特异性 DNA 序列，与实施例一相同，是 pUC18 载体上的一段，与之相应，用于杂交的 DNA 选用 pUC18 载体。

将芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为 8.7uA（vs.Ag/AgCl，200mv）。

提取 pUC18 质粒 DNA（10uL ，约 1ug），沸水浴 5 分钟，迅速置于冰上，使 DNA 变性。

将变性的 pUC18 质粒点在基点上，37℃保温 2 小时。

用 dd H_2O 清洗芯片，并将芯片置于 45℃的 dd H_2O 中漂洗数次，约 30 分钟。dd H_2O 即双蒸水。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为 2uA（对 Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有 pUC18 质粒。

本实施例与实施例一相比，仅在形成茎环结构的序列发生变化，结果表明，该专利方法中的茎环结构区域的 DNA 序列可以进行变化。

实施例三

本例购买或合成含有下述结构的 DNA 探针的，所带电化学基团为羧基二茂铁的电信号检测的基因芯片：

$5'\text{-NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-GCG AG}-\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}-\text{CT CGC-(CH}_2)_6\text{-SH-3}'$

$\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}$为本实验中选用的特异性 DNA 序列，是短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因中的一段，与之相应，用于

杂交的 DNA 选用含有这段基因的质粒载体。

将芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为 10uA（vs.Ag/AgCl，200mv）。

提取含有短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的质粒 DNA（10uL，约 1ug），沸水浴 5 分钟，迅速置于冰上，使 DNA 变性。

将变性的质粒点在基点上，37℃保温 2 小时。

用 dd H_2O 清洗芯片，并将芯片置于 45℃的 dd H_2O 中漂洗数次，约 30 分钟。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为 2uA（对 Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因。

本实施例与实施例一相比，仅在待检测的特异性 DNA 序列发生变化，结果表明，该专利方法中的特异性 DNA 区域的序列可以进行变化，即该专利方法可以用来检测多种特异性 DNA 的存在。

实施例四

本例为电子基因芯片的制备与检测的整个过程的实施例。

首先，取芯片基质选用玻璃片,硅片与陶瓷片，进行试验。在这三种基质覆盖上掩模（上有一小孔及从该孔导出的电路），真空喷镀上一层约 10nm 的钛，然后再喷镀上一层约 300 nm 金，形成 DNA 探针的固定化表面以及电路。检测表面光滑度。经检测，硅片上镀

金后，表面最为光滑。选用硅片基质继续试验。

用以下三种方法处理已镀金的硅片：

a.用等离子体处理，然后迅速置于乙醇溶液中；

b.用紫外-臭氧处理箱处理，再用饱和 KOH 处理；

c.用 piranha 溶液(70%浓硫酸/30%双氧水)处理 30min，然后在一定电位下于 0.5 M KOH 溶液中电化学清洗。

结果表明，以上三种方法均为可行未见明显差异。清洗后的芯片保存于乙醇中备用。

合成结构如下所示的 DNA 序列：

$5'\text{-NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-GCG AG}-\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}-\text{CT CGC-(CH}_2)_6\text{-SH-3'}$

$\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}$为本实验中选用的特异性DNA序列，是短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因中的一段，与之相应，用于杂交的 DNA 选用含有这段基因的 PCR 产物。

人工将制备好的 DNA 探针(1 uL, 1 mM)点在基点上，覆盖表面后室温过夜。

将含有 5 uL,3 mM 电化学基团（羧基二茂铁）的溶液点在已固定的 DNA 表面，再加入 10 mM EDC/10 mM NHS，反应 1h。

将硅片浸于 10 mM 的 $\text{SH-(CH}_2)_6\text{-OH}$ 乙醇溶液中，等待杂交。用于电信号检测的基因芯片制作完成。

将芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为 10uA（vs. Ag/AgCl，200mv）。

将短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的 PCR 产物（5uL ，约 0.5ug）沸水浴 5 分钟，迅速置于冰上，使 DNA 变性。

将变性的 pUC18 质粒点在基点上，37℃保温 2 小时。

用 dd H_2O 清洗芯片，并将芯片置于 45℃的 dd H_2O 中漂洗数次，约 30 分钟。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为 2uA（对 Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因。

本实施例与实施例三相比，仅在样品的来源发生变化，实施例三中样品为提取的质粒 DNA，本实施例中样品为 PCR 的产物。结果表明，该专利方法所需样品可来自多种不同的方法。

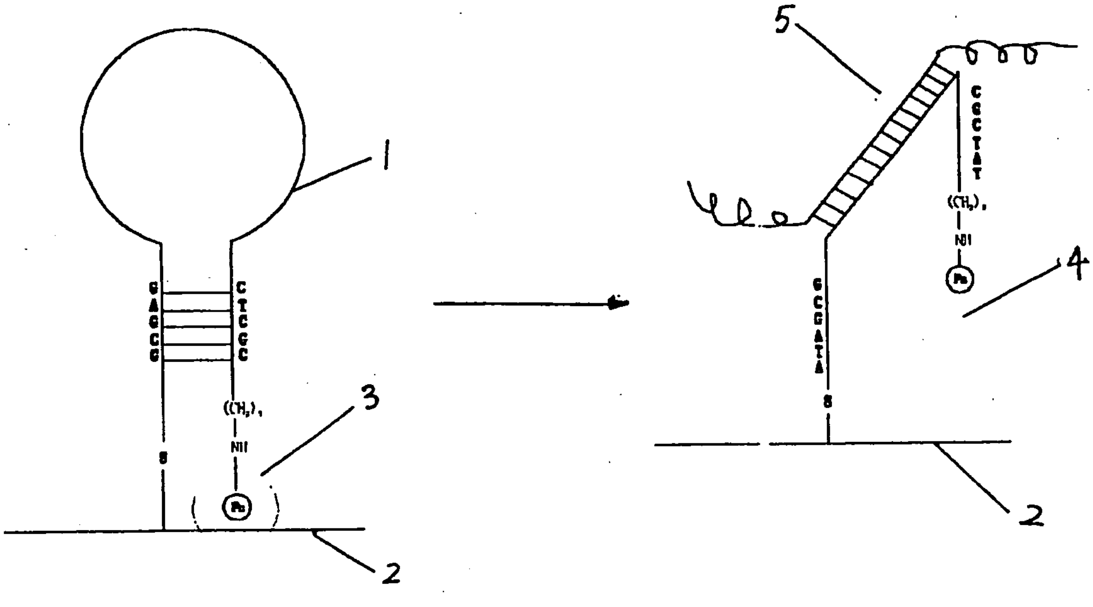

1
G A G C G
C T C G C
$(CH_2)_n$
NH
S
Fc
3
2
5
C G C T A T
$(CH_2)_n$
NH
Fc
4
G C G A T A
S
2

图 1

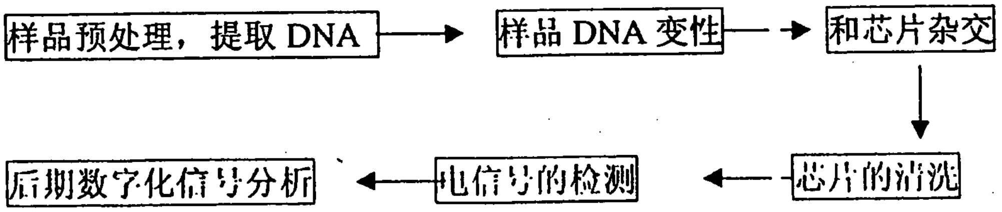

样品预处理，提取 DNA
样品 DNA 变性
和芯片杂交
芯片的清洗
电信号的检测
后期数字化信号分析

图 2